

VESI- JA YMPÄRISTÖHALLITUKSEN MONISTESARJA

Nro 489

**MYRKYLLISYYDEN ARVIOINTI
EKOTOKSIKOLOGISILLA
VESITUTKIMUSMENETELMILLÄ**

Kari Holopainen

Nro 489

**MYRKYLLISYYDEN ARVIOINTI
EKOTOKSIKOLOGISILLA
VESITUTKIMUSMENETELMILLÄ**

Kari Holopainen

**Vesi- ja ympäristöhallitus
Helsingin vesi- ja ympäristöpiiri
Helsinki 1993**

Tekijä on vastuussa julkaisun sisällöistä eikä siihen voida vedota vesi- ja ympäristöhallituksen virallisena kannanottona.

Julkaisua saa Helsingin vesi- ja ympäristöpiiristä.

ISBN 951-47-7355-1

ISSN 0783-3288

Painopaikka: Vesi- ja ympäristöhallituksen monistamo, Helsinki 1993

Julkaisija

Vesi- ja ympäristöhallitus ja
Helsingin vesi- ja ympäristöpiiri

Julkaisun päivämäärä

Toukokuu 1993

Tekijä(t) (toimielimestä: nimi, puheenjohtaja, sihteeri)

Kari Holopainen

Julkaisun nimi (myös ruotsinkielinen)

Myrkyllisyyden arviointi ekotoksikologisilla vesitutkimusmenetelmillä
(Evaluering av toxicitet med ekotoxikologiska vattenundersökningsmetoder)

Julkaisun laji

Selvitys

Toimeksiantaja

Helsingin vesi- ja ympäristöpiiri

Toimielimen asettamispvm

Julkaisun osat

Tiivistelmä

Selvityksen tarkoituksena on tehdä tunnetuksi ja edistää bakteereilla, levillä, vesikirpuilla ja kaloilla suoritettavien toksisuustestien käyttöä veden myrkyllisyysarvioinnissa. Raportissa on esitetty Suomen lainsäädännön ja hallinnon suomat mahdollisuudet toksisuustestien käyttöön sekä esitelty mahdolliset testimenetelmät. Haitallisten aineiden ympäristövaarallisuutta on arvioitu yhdisteiden toksisuuden ohella myös niiden kertyvyyden ja pysyvyyden kannalta. Esityksessä on käsitelty myös toksisuustestien standardisointia ja testipalvelujen saatavuutta.

Asiasanat (avainsanat)

Myrkyllisyys, toksisuus, testimenetelmät, vesitutkimus

Muut tiedot

Sarjan nimi ja numero

Vesi- ja ympäristöhallituksen
monistesarja nro 489

ISBN

951-47-7355-1

ISSN

0783-3288

Kokonaissivumäärä

36

Kieli

Suomi

Hinta

Luottamuksellisuus

Julkinen

Jakaja

Helsingin vesi- ja ympäristöpiiri
PL 58
00421 HELSINKI

Kustantaja

Vesi- ja ympäristöhallitus
PL 250
00101 HELSINKI

Utgivare
Vatten- och miljöstyrelsen och
Helsingfors vatten- och miljödistrikt

Utgivningsdatum

Maj 1993

Författare (uppgifter om organet: namn, ordförande, sekreterare)
Kari Holopainen

Publikation (även den finska titeln)
Evaluering av toxicitet med ekotoxikologiska vattenundersökningsmetoder
(Myrkyllisyyden arviointi ekotoksikologisilla vesitutkimusmenetelmillä)

Typ av publikation
Utredning

Uppdragsgivare
Helsingfors vatten- och miljödistrikt

Datum för tillsättandet av organet

Publikationens delar

Referat

Utredningens syfte är att bekantgöra och befrämja användningen av toxicitetstest med bakterier, alger, vattenloppor och fiskar vid evaluering av vattnets toxicitet. I rapporten redovisas de möjligheter Finlands lagstiftning och förvaltning erbjuder för användningen av toxicitetstest. Möjliga testmetoder presenteras. Skadliga ämnens miljöfarlighet evalueras både beträffande deras toxicitet och med beaktande av deras anrikning och beständighet. Även standardiseringen av toxicitetstesten och tillgängligheten av testningsservice behandlas.

Sakord (nyckelord)

Giftighet, toxicitet, testmetoder, vattenforskning

Övriga uppgifter

Seriens namn och nummer
Vatten- och miljöstyrelsens
duplikatserie nr 489

ISBN
951-47-7355-1

ISSN
0783-3288

Sidantal
36

Språk
Finska

Pris

Sekretessgrad
Offentlig

Distribution
Helsingfors vatten- och miljödistrikt
PB 58
00421 HELSINGFORS

Förlag
Vatten- och miljöstyrelsen
PB 250
00101 HELSINGFORS

ALKUSANAT

Vesistöihin kohdistuva toksisten vaikutusten vähentäminen on tärkeä vesiensuojelun tavoite. Tämän selvityksen pyrkimyksenä on tehdä tunnetuksi ja edistää bakteereilla, levilla, vesikirpuilla ja kaloilla suoritettavien toksisuustestien käyttöä veden myrkyllisyysarvioinnissa. Aineisto on koottu pääosin henkilökohtaisten kontaktien ja kirjallisuuden perusteella. Erityiskiitokset haluan osoittaa Marja Ruopalle (VYH) ja Jukka Ahtiaiselle (VYH) asiantuntevasta avusta.

Helsingissä 1.5.1993

Kari Holopainen

SISÄLLYS

ALKUSANAT	5
1 JOHDANTO	11
2 LAINSÄÄDÄNNÖLLISET JA HALLINNOLLISET MAHDOLLISUUDET	11
2.1 Vesilaki	11
2.2 Kemikaalilaki	11
2.3 Ympäristövaikutuksen arviointi	12
3 VESISTÖVAARALLISUUDEN ARVIOINTI	12
3.1 Yleistä	12
3.2 Myrkyllisyyteen vaikuttavista muuttujista	13
3.2.1 Fysikaalis-kemialliset tekijät	13
3.2.1.1 Lämpötila	13
3.2.1.2 Happamuus	13
3.2.1.3 Kovuus	13
3.2.1.4 Saliniteetti	13
3.2.1.5 Happi	13
3.2.1.6 Valo	14
3.2.2 Biologiset tekijät	14
3.2.2.1 Sukupuoli	14
3.2.2.2 Kehitysaste	14
3.2.2.3 Ravinto	14
3.2.2.4 Kilpailu ja saalistus	14
3.2.3 Muut tekijät	14
4 BIOLOGISET MENETELMÄT	15
4.1 Yleistä	15
4.2 Akuutit testimenetelmät	15
4.3 Krooniset testimenetelmät	15
4.3.1 Käyttäytymistutkimukset	16
4.3.2 Histologiset ja fysiologiset tutkimukset	16
4.3.2.1 Kunto- ja rasitusmuuttujat	16
4.3.2.2 Aineenvaihduntamuuttujat	16
4.3.2.3 Kudosvauriomuuttujat	16
4.3.2.4 Vierasaineaineenvaihdunta	17
4.3.3 Lisääntymistutkimukset	17
4.3.4 Kasvu	17
4.4 Testimenetelmistä	17
4.4.1 Levätestit	17
4.4.1.1 Yleistä	17
4.4.1.2 Standardimenetelmät	17

4.4.1.3	Muita menetelmiä	18
4.4.2	Eläinplanktontestit	18
4.4.2.1	Yleistä	18
4.4.2.2	Standardimenetelmät	18
4.4.2.3	Muita menetelmiä	19
4.4.3	Kalatestit	19
4.4.3.1	Yleistä	19
4.4.3.2	Standardimenetelmät	19
4.4.3.2.1	Letaalitestit	19
4.4.3.2.2	Subletaalitestit	20
4.4.3.3	Muut testit	20
4.4.4	Bakteeritestit	20
4.4.4.1	Yleistä	20
4.4.4.2	Valobakteeritesti	20
4.4.4.3	Kasvunestymistesti	21
4.4.4.4	Muut testit	21
4.4.4.4.1	Hapenkulutuksen estymistestit	21
4.4.4.4.2	Heterotrofisen potentiaalin mittaaminen	21
4.5	Myrkyllisyysarvioinnista	21
4.5.1	Lyhytaikaiset menetelmät	21
4.5.2	Pitkäaikaiset menetelmät	22
4.6	Hajoavuus	23
4.6.1	Yleistä	23
4.6.2	Testien periaatteet	23
4.6.3	Menetelmät	23
4.6.4	Soveltuvuus	24
4.7	Kertyvyys	24
4.7.1	Yleistä	24
4.7.2	Biokonsentraatiokerroin	24
4.7.3	Oktanoli/vesi -jakaantumiskerroin	25
4.8	Mutageenisuus	25
4.8.1	AMES-testi	25
4.8.2	MUTATOX-testi	25
5	YMPÄRISTÖVAARALLISUUDEN ARVIOINTI	26
5.1	Yleistä	26
5.2	Testiohjelmat	27
5.2.1	Perustiedot	27
5.2.2	Testaussuosituksia	27
5.3	Kemiallinen vaikutusten arviointi	27
6	TOKSISUUSTESTIEN STANDARDISOINNISTA	28
7	TOKSISUUSTESTIEN TUTKIMUS- JA KÄYTTÖÖNOTTOMAHDOLLISUUDET	28
7.1	Vesi- ja ympäristöviranomaiset	28

7.2	Yliopistot	29
7.2.1	Helsingin yliopisto	29
7.2.2	Joensuun yliopisto	29
7.2.3	Jyväskylän yliopisto	29
7.2.4	Kuopion yliopisto	29
7.2.5	Turun yliopisto	30
7.2.6	Åbo Akademi	30
7.3	Oy keskuslaboratorio	30
7.4	Suomen Ympäristötutkijaryhmä Oy	30
7.5	Vaasan kaupungin maanviljelys- ja kauppakemiallinen laboratorio . .	30
7.6	Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus	30
8	YHTEENVETO	31
	KIRJALLISUUS	32
	LIITTEET	35

1 JOHDANTO

Kemikaalien ja jätevesien käyttäytymisen ja vaikutusten tunteminen vesiympäristössä luo pohjan päästöjen valvontaan ja säätelyyn. Suomessa ei veden kemiallisen laadun eikä haitallisten aineiden seuranta ja arviointi ole riittävää. Kuormituksen aiheuttamat muutokset vaikuttavat koko vesiekosysteemiin ja ne voidaan osoittaa biologisilla testimenetelmillä ja kenttätutkimuksilla.

Haitallisuuden arviointiin tarvitaan aluksi tietoa vesiekosysteemin potentiaalisesta altistuksesta ja altistumisanalyysi määrää vaikutusanalyysin laajuuden ja suunnan. Vaikutusanalyysissä pyritään selvittämään haitallista kuormitusta ja sen merkitystä hakemalla yhteyttä veden laadun ja vesistövaikutuksen sekä päästöjen ja kemikaalien välille.

2 LAINSÄÄDÄNNÖLLISET JA HALLINNOLLISET MAHDOLLISUUDET

Suomessa toksisuustestejä tulee käyttää laajemmin arvioitaessa myrkkykuormitusten ja päästöjen vaikutusta. Tähän ovat olemassa selvät lainsäädännölliset ja hallinnolliset mahdollisuudet.

2.1 Vesilaki

Vesilain 1:19 vesistön, 1:20 vesistöä pienemmän vesiuoman ja 1:22 pohjaveden mukainen pilaantumiskielto.

Vesilain 10:24 mukaiset lupahakemusasiat, joidenka sisällöstä määrätään asetuksessa 282/62 kohdassa 3:71.

Vesiasetuksen 282 4:72 katselmustoimituksiin liittyvät selvitykset.

Vesilain 10:24a mukaiset päästömääräykset, toimenpide- ja tarkkailuvelvoitteet.

Vesiensuojelun ennakkotoimenpideasetuksen 283/62 kohdan 1 luettelemien aineiden päästämisestä ja johtamisesta ympäristöön ei saa aiheutua pohjaveden ja vesistön pilaantumista.

2.2 Kemikaalilaki

Vuonna 1990 voimaan astuneen kemikaalilain mukaan kuuluvat vesi- ja ympäristöhallinnolle kemikaalien ympäristöhaittojen ehkäiseminen ja torjunnan ylin valvonta. Uusimpia tehtäviä ovat uusien aineiden ilmoitusmenettely, suojauskemikaalien ennakko-kohtyväksyminen ja kiellettyjen tai voimakkaasti rajoitettujen kemikaalien vienti-ilmoitusmenettely. Lain mukaan viranomaisilla tulee olla pysyviä valmiuksia kemikaalien

ympäristölle aiheuttamien vaikutusten ja riskien arvioinnissa. Haittojen arviointi ja ehkäisy edellyttää tietoja kemikaalien käytöstä, kulkeutumisesta, käyttäytymisestä ja ympäristövaikutuksista.

2.3 Ympäristövaikutuksen arviointi

Euroopan yhteisöjen direktiivi eräiden julkisten ja yksityisten hankkeiden ympäristövaikutusten arvioinnista, 85/337/EEC, velvoittaa jäsenmaita kehittämään lainsäädäntöään ympäristövaikutusten arviointimenettelyn toteuttamiseksi. EY-direktiivi ja ECE:n Espoon yleissopimus edellyttävät suurilta hankkeilta määrämuotoista menettelyä. Ympäristöministeriö esittää ympäristövaikutusten arviointia koskevassa lakiehdotuksessa eri hankkeiden nykyistä tarkempaa ympäristövaikutusten puntarointia jo suunnitteluvaiheessa. Lakiehdotus annetaan eduskunnalle keväällä 1993. Arviointimenettelyä sovelletaan hankkeisiin, joilla saattaa olla merkittäviä ympäristövaikutuksia. Tällaisiksi hankkeiksi YVA 92-työryhmän mietintö luettelee mm. ydinvoimalat, paperitehtaat, satamat ja moottoritiet. Lain piiriin tulevista hankkeista säädetään erikseen annettavalla asetuksella. Laki antaa kuitenkin yksittäistapauksissa mahdollisuuden arvioida muidenkin hankkeiden ympäristövaikutuksia silloin kun ne todennäköisesti muodostuisivat merkittäviksi. Arviointimenettelyn järjestämisestä vastaavina yhteysviranomaisina olisivat lääninhallitus, vesi- ja ympäristöpiiri sekä kauppa- ja teollisuusministeriö. YVA sisältää mm. hankkeeseen liittyvät perustutkimukset, eri vaihtoehtojen vaikutusten vertailemisen (biologiset, kemialliset, sosiologiset ja ekonomiset) ja seurantasuunnitelman.

3 VESISTÖVAARALLISUUDEN ARVIOINTI

3.1 Yleistä

Arviointi jakaantuu altistumisen ja vaikutusten arviointiin. Vesistöön joutuneen kemikaalin tai jäteveden fysikaaliseen ja kemialliseen käyttäytymiseen vaikuttaa vesistön hydrologia, veden laatu ja vuodenaika, jotka päästömäärän kanssa määräävät eliöiden saaman annoksen. Vesiekosysteemin potentiaalisen altistuksen arviointiin tarvitaan tietoja:

- kemikaaleista
- päästön määrästä ja laadusta
- päästön jakautumisesta ympäristöön (vesi, sedimentti, maa, ilma, eliöstö)
- kemikaalien tai jäteveden käyttäytymisestä (liukoisuus, laimeneminen, leviäminen, hajoavuus, kertyvyys ja rikastuvuus)
- biologinen saatavuus (aineen molekyylikoko)

Altistumistiedot saadaan kirjallisuudesta ja biokemiallisista kokeista. Altistumisanalyysi määrää vaikutusanalyysin laajuuden ja suunnan. Vaikutusanalyysissä tarkastellaan myrkyllisyydesteillä ja kenttäkokeilla haittavaikutuksia vesistössä ja alhaisimpia vaikuttavia pitoisuuksia.

3.2 Myrkyllisyyteen vaikuttavista muuttujista

3.2.1 Fysikaalis-kemialliset tekijät

Vesistöön joutuneiden myrkyllisten yhdisteiden pitoisuus riippuu mm. laimenemisolosuhteista, veden lämpötilasta, happamuudesta ja happimäärästä, aineiden reaktiivisuudesta ja reaktioista, aineiden haihtuvuudesta, hajoavuudesta, adsorpoituvuudesta ja sedimentoituvuudesta. Toksisuutta on laajasti tutkittu lämpötila-, happamuus-, kovuus- ja saliniteettivaikutusten suhteen.

3.2.1.1 Lämpötila

Lämpötilan vaikutus toksisuuteen ei ole yksiselitteinen, mutta yleisesti ympäristön lämpötilan kohoaminen vilkastuttaa vaihtolämpöisten vesieliöiden aineenvaihduntaa aiheuttaen myrkyvaikutuksen nopeuden kasvun.

3.2.1.2 Happamuus

Eliöiden biologiset ja veden kemialliset tekijät vaikuttavat yhdisteiden myrkyllisyyteen. Happamuuden vesieliöille aiheuttama rasitus vaihtelee eri lajien välisten herkkyyksien takia. Veden happamuus vaikuttaa ionisoituvien yhdisteiden esiintymismuotoihin, metalli-ionien kiinnittymiseen partikkeleihin ja kolloidin muodostumiseen. Varautumattomat orgaaniset yhdisteet ovat yleensä varauksellisia myrkyllisempiä helpomman solukulkeutuvuutensa vuoksi.

3.2.1.3 Kovuus

Veden kovuus ei muutu nopeasti vesistössä, koska valuma-alueen geologialla on merkittävä vaikutus veden kovuuteen. Yleensä veden kovuuden ja korkean alkaliniteetin on todettu vähentävän vesistön myrkyvaikutuksia. Kalsium- ja magnesiumionit vaikuttavat etenkin akuuteissa testeissä antagonistisesti.

3.2.1.4 Saliniteetti

Veden suolapitoisuudella on erityisesti merkitystä osmoregulaatioon. Saliniteetin nousu lisää myrkyvaikutusta makean veden eliöille ja vaikutus merieliöille on päinvastainen.

3.2.1.5 Happi

Veden happipitoisuuden alentuessa myrkyvaikutus useimmille vesieliöille voimistuu. Esimerkiksi kalojen hengitystaajuus lisääntyy ja tämän ylimääräisen rasitteen lisäksi ne joutuvat pumppaamaan kidustensa läpi suurempia vesimääriä.

3.2.1.6 Valo

Valaistus saattaa vaikuttaa myrkyllisten yhdisteiden käyttäytymiseen (fotokemiallinen hajoaminen). Erityisesti pitkäaikaistesteissä valorytmillä on merkitystä toksisuuteen, sillä valojakson pituus vaikuttaa hormonitoiminnan muutoksiin lisääntymiskierron ajoittumisen mukaan.

3.2.2 Biologiset tekijät

Biologisina tekijöinä toksisuuteen vaikuttavat mm. vesieliöiden sukupuoli, kehitysaste, ravinto, kilpailu ja saalistus.

3.2.2.1 Sukupuoli

Myrkyllisten yhdisteiden kertyminen esim. kalaan ja siten myös niiden toksisuus riippuu sukupuolesta. Koiraiden on todettu olevan herkempiä myrkkövaikutuksille kuin naaraiden. Kalojen rasvapitoisuus sekä vierasaineaineenvaihdunta riippuvat sukupuolesta. Naaraat voivat lisäksi poistaa haitallisia yhdisteitä mädin mukana.

3.2.2.2 Kehitysaste

Eliöiden ikääntyessä niiden herkkyys myrkyllisille aineille yleensä vähenee erityisesti vedessä elävillä selkärangattomilla. Kalat ovat erittäin herkkiä haitta-aineiden vaikutuksille lisääntymisaikana ja varhaisessa kehitysvaiheessa.

3.2.2.3 Ravinto

Ravinnon on todettu vaikuttavan eliöiden herkkyyteen myrkyllisille aineille. Toksisuustesteissä tämä on mm. huomioitu dieetteinä ennen testiä.

3.2.2.4 Kilpailu ja saalistus

Lajien sisäiset ja lajien väliset kilpailut sekä saalistus voivat voimistaa yksilöiden myrkytystilasta ja lajille aiheutuvia haittoja. Saastuneissa vesistöissä kestävämmät lajit pääsevät valtaan.

3.2.3 Muut tekijät

Monet myrkyllisyystestit on tehty puhtailla aineilla, mutta jätevesien ja kemikaalien testauksessa luonnossa aineet reagoivat keskenään ja muuttuvat, jolloin myrkyllisten aineiden yhteisvaikutus määrää toksisuuden. Kemikaaleilla yhteisvaikutus voi olla additiivinen, antagonistinen tai synergistinen.

4 BIOLOGISET MENETELMÄT

4.1 Yleistä

Biologiset testit voidaan ryhmitellä kestoajan (akuutti/krooninen), vaikutustavan (letaali/subletaali) tai vaikutuskohteen (lisääntyminen, kasvu, kuolevuus) perusteella. Testityyppien väliset rajat eivät ole jyrkkiä ja vaikutukset voivat eri ryhmissä olla tappavia tai ei-tappavia.

4.2 Akuutit testimenetelmät

Akuutit toksisuustestit ovat yleisin ja nopein tapa jäteveden tai kemikaalin alustavassa myrkkyarvioinnissa. Kemikaali tai jätevesi on akuutisti toksista, jos lyhyen altistusajan, korkeintaan 96 tunnin, aikana koe-eliöille on aiheutunut huomattavat haittavaikutukset. Testeillä pyritään määrittämään kemikaalin tai jäteveden LC50-arvo, missä pitoisuudessa määrättyä koeaikana aiheutuu 50 % kuolleisuus koeorganismeille. Kuolleisuus on verrannollinen tutkittavan aineen pitoisuuteen ja altistusajan pituuteen. Akuuteilla testeillä määritetään myös EC50-pitoisuus (levillä käytetään myös IC50-arvoa), jossa puolella koe-eliöistä ilmenee koeaikana jokin määriteltävä myrkkyyvaikutus. Lyhytaikaiset testit ovat laajasti standardisoituja ja tulokset täten vertailukelpoisia. Testimateriaalina voidaan käyttää kaloja, vesikirppuja, leviä ja bakteereita.

4.3 Krooniset testimenetelmät

Pitkäaikaiset testimenetelmät ovat välttämättömiä todellisten myrkkyyvaikutusten selvittämiseksi, koska jätevedet ja kemikaalit laimenevat vastaanottavassa vesistössä yleensä nopeasti alle akuutisti tappavan tason. Toisaalta krooninen myrkkyyvaikutus voi johtua eri aineista ja tekijöistä kuin akuuttitoksisuus.

Pitkäaikaiskokeiden ja subletaalitestien tarkoituksena on löytää myrkkyyvaikutuksen kohde ja pitoisuus, jossa vaikutuksia ei enää ole todettavissa. Krooniset testit ovat vaativia, koska niiden tulee kestää vähintään suurimman osan eliön koko elämänkierron. Tämä rajoittaa pitkäikäisten ja hitaasti sukukypsyys saavuttavien vesieliöiden käyttöä. Testimenetelmien kehittämisessä tavoitteena on ollut testiajan lyhentäminen (vesikirppu 14 vrk) ja testien suuntaaminen koe-eliöiden herkkiin elämänvaiheisiin (kalojen sikiökehityksen kehitys, lisääntyminen ja mätä-poikasvaiheet).

4.3.1 Käyttäytymistutkimukset

Tutkimuksissa voidaan seurata toksisuuden vaikutusta kalojen liikkumiseen, uintikykyyn ja hengitysliikkeisiin tai simpukoiden kuoren liikkeisiin, ruokailuaktiivisuuteen ja kaivautumiseen. Liikkeitä seurataan tavallisesti valosähköön ja ääniaaltoon perustuvilla laitteilla. Kalojen uintikyvyn heikkenemistä on tutkittu mm. pyörivän vesivirran tekniikalla ja orientautumiskäyttäytymistä valintakammioilla. Kalan pintaan kohdistuva myrkkyyvaikutus vaurioittaa kudosten epiteeliä, jolloin kalan hengittäminen vaikeutuu. Hengitysfrekvenssin tiheneminen aiheuttaa myrkkyyvaikutusten lisääntymisen.

4.3.2 Histologiset ja fysiologiset tutkimukset

Myrkylliset aineet saattavat muuttaa vesieliöiden kudusrakenteita, jotka voidaan havaita kudოსleikkeistä histologisissa tutkimuksissa. Fysiologisissa tutkimuksissa verestä ja kudoksista mitataan muuttuneita elintoimintoja ja aineenvaihduntaa kuten hapenkuljetuskykyä, energia-aineenvaihduntaa, soluvaurioita, suola-vesitasapainoa sekä vierasaine-aineenvaihduntaa.

4.3.2.1 Kunto- ja rasitusmuuttujat

Kalojen veren hemoglobiini- (Hb) ja keskihemoglobiinipitoisuus (MCHC) sekä punasolujen suhteellinen osuus kokoverestä (Hkr) kuvaavat kalojen kuntoa ja rasitusta. Anemia aiheutuu usein kidusvaurioista tai plasman ionitasapainon aiheuttamasta veren laimenemisesta. MCHC:n aleneminen johtuu yleensä punasolujen rasitusperäisestä turpoamisesta. Punasolujen koon pysyessä muuttumattomana Hkr- ja Hb-arvon muutokset aiheutuvat samoista tekijöistä.

4.3.2.2 Aineenvaihduntamuuttujat

Kaloilla tärkeimmät aineenvaihduntareaktiot tapahtuvat maksassa. Maksan ja lihaksen glykogeenipitoisuudet kuvaavat helposti käytettäviä energiavaroja. Akuutissa rasituksessa glykogeeni kuluu nopeasti. Plasman glukoosipitoisuus yleensä kohoaa lyhyessä rasituksessa ja alenee pitkäaikaisessa rasituksessa ja paastossa. Plasman normaalisti alhainen maitohappopitoisuus kohoaa huomattavasti ulkoisen tai aineenvaihdunnallisen häiriön seurauksena.

4.3.2.3 Kudusvauriomuuttujat

Kudosvaurioita voidaan todeta määrittämällä kudospäräisten entsyymien aktiivisuuksia kudoksista tai plasmasta. Kalojen kudosten ja plasman entsyymien, aspartaattiaminotransferaasin (ASAT), aktiivisuuden muutokset aiheutuvat mm. raskametallien myrkkyyvaikutuksista. Asetyylikoliiniesteraasin (AChE) aktiivisuuden muutokset heijastavat hermostollisia vaurioita.

4.3.2.4 Vierasaineaineenvaihdunta

Vierasaineaineenvaihdunta muuttaa sekä ympäristöstä peräisin olevat myrkylliset aineet että eliöiden omassa aineenvaihdunnassa syntyneet elintoiminnoille haitalliset yhdisteet vesiliukoisiksi helposti eritettäviksi. Myrkkyjen reaktiivisuus ja genotoksisuus saattavat aluksi detoksikaatioentsyymien aiheuttamassa hapetuksessa lisääntyä. Vierasaineaineenvaihdunta on kaloilla vilkkainta maksassa. Entsyymien UDP-GT ja BG aktiivisuuksien muutokset kuvaavat pyrkimyksiä vapautua haitallisista aineista.

4.3.3 Lisääntymistutkimukset

Veden myrkyllisyys heikentää vesieliöiden lisääntymistä ja vaikuttaa lajien säilymiseen. Kaloilla tämä ilmenee vähentyneenä mädin tuotantona ja hedelmöittymisenä sekä häiriönä hedelmöittyneen mädin kehityksessä, poikasten kuoriutumisessa ja kehityksessä. Kalojen mätä- ja poikasvaiheet on todettu monissa elämänvaihetesteissä erittäin herkiksi myrkkyvaikutusten osoittajiksi.

4.3.4 Kasvu

Eliöiden kasvu yleensä hidastuu myrkyllisten aineiden vaikutuksesta. Kasvunopeuden mittaaminen on yksinkertaista ja nopeaa.

4.4 Testimenetelmistä

4.4.1 Levätestit

4.4.1.1 Yleistä

Levät ovat perustuottajia vesiekosysteemin useimmissa ravintoketjuissa ja levien kasvun tai lisääntymisen häiriintyminen myrkyllisten yhdisteiden takia saattaa vaikuttaa koko muun eliöyhteisön toimintaan ja koostumukseen. Levien nopean solujen jakautumisen vuoksi myrkkyjen vaikutus nähdään nopeasti.

Levätestejä käytettiin aluksi veden tuotantokyvyn mittaamiseen ja vasta 1970-luvulta lähtien kemikaalien myrkyllisyyden arviointiin. Levätestien standardisoinnissa päämääränä on ollut yksinkertaisten ja luotettavien rutiinitestien kehittäminen sekä myös monimutkaisten ja paremmin luonnonolosuhteita vastaavien testien kehittäminen.

4.4.1.2 Standardimenetelmät

Standarditestit ovat staattisia yhdellä levälajilla tehtyjä testejä. Levälajit kuuluvat yleensä viherleviin. Testeihin sopivia yksisoluisia viherleviä ovat *Selenastrum capricornutum*, *Ankistrodesmus falcatus* ja murtovesiin hyvin soveltuva *Chlorella kesslerii*.

Testeissä käytetään leväpuhdasviljelmiä, joita kasvatetaan keino-olosuhteissa ravinneliuoksissa vakio-olosuhteissa. Siirroksen kasvua tai yhteyttämistä seurataan 1–4 vuorokautta mittaamalla kasvua solulukumäärän kasvuna tilavuusyksikköä kohden ja yhteyttämistä radioaktiivisen hiilen sitoutumisena. Mittauksessa voidaan käyttää esim. partikkelianalysaattoria, mikroskooppia, laskentakammiota, verisolulaskinta, sameusmittaria, spektrofotometriä tai kolorimetriä. Saaduista tuloksista piirretään kasvukäyrät eri myrkkypitoisuuksissa ja määritetään viherlevän kasvun inhibitiokäyrä, josta saadaan EC 50-, EC 20- ja EC 80-arvot.

Standardimenetelmät mittaavat akuuttista toksisuutta. Testit soveltuvat vesiliukoisille aineille ja jätevesille, joiden haihtuminen ja hajoaminen on vähäistä. Menetelmällisesti kaikki standardit ovat samankaltaisia. Standardeista mainittakoon kansallinen SFS 5072 (1986) ja kansainvälinen ISO 8692 (1989). Eurostandardi (CEN) on myös tulossa.

4.4.1.3 Muita menetelmiä

Testejä on tehty myös usealla levälajilla ja luonnonlevästöllä levien välisen kilpailuvaihtuuden eliminoimiseksi. Staattisten testien sijasta on kokeiltu puolikemostaatti- ja kemostaattitestejä, joissa testiliuos vaihtuu ja levä-, ravinne- ja myrkkypitoisuudet voidaan pitää halutulla tasolla, jolloin saadaan tietoa mm. myrkkujen pitkäaikaisvaikutuksista.

Luonnossa tehtävissä dialyysitesteissä levät ovat ravinteita ja myrkkyjä läpäisevissä dialyysipusseissa. Mahdollisimman lähelle luonnonolosuhteita päästään mikrokosmostesteillä, joissa tutkitaan kemikaalien vaikutusta koko eliöyhteisöön. Testit ovat kuitenkin hyvin pitkiä, monimutkaisia ja kalliita.

4.4.2 Eläinplanktonitestit

4.4.2.1 Yleistä

Eläinplankton soveltuu hyvin myrkkyarviointiin, koska se on lähes kaikkien kalalajien ravintoa ainakin jossakin elämänvaiheessa ja lisäksi eläinplankton lisääntyy helposti ja testeissä tarvittava laboratoriolaitteisto on yksinkertainen. Einar Naumann teki toksikologisia kokeita *Daphnia magna* -vesikirpuilla jo 30-luvun alussa.

4.4.2.2 Standardimenetelmät

Kansallinen akuuttia myrkyllisyyttä mittaava standardi SFS 5062 (1984) eroaa kansainvälisestä standardista, ISO 6341 (1989) erityisesti laimennusveden kovuuden osalta. Tutkittavista liuoksista valmistetaan laimennussarja ja vesikirput pipetoidaan laimennusveden mukana. EC50-arvot voidaan määrittää esim. graafisella tai potenssifunktio- menetelmällä. Graafisessa menetelmässä lasketaan jokaisessa pitoisuudessa liikkuvat vesikirput ainoastaan yhden tai kahden vuorokauden kuluttua ja liikkuvien vesikirppujen osuuden tulee olla vähintään 10 ja enintään 90 prosenttia. Potenssifunktio- menetelmässä

vuorokauden mittaisessa testissä lasketaan liikuntakykyisten vesikirppujen määrä vähintään kolmesti ja kahden vuorokauden testissä viidesti. Jokaisesta pitoisuudesta, jossa yli 10 % vesikirpuista on liikkumattomia, lasketaan niiden keskimääräinen selviytymisaika, MST, lineaarisella regressiolla. EC50-arvo voidaan määrittää, kun tiedetään MST-arvon riippuvuus pitoisuuden funktiona.

4.4.2.3 Muita menetelmiä

OECD:n menetelmäsuosituksissa (202) vuodelta 1981 suositellaan subletaalitestiksi vesikirppu *Daphnia*lle 14 vuorokauden elämäntestit. Testissä pyritään selvittämään veden toksisuuden vaikutuksia vesikirppujen kasvuun, lisääntymiskykyyn ja kuolevuuteen. Samassa yhteydessä on esitetty akuuttitoksisuuden testi. Testit ovat melko väljiä ja antavat mahdollisuuksia mm. erilaisten koeolosuhteiden valintaan.

Pitkäaikaistestiehdotus, ISO/N28, muistuttaa OECD:n mallia ja eroaa tästä lähinnä pidemmän testiajan (21 päivää) takia.

4.4.3 Kalatestit

4.4.3.1 Yleistä

Kaloja on käytetty toksisuuden arvioinnissa jo 1800-luvun puolivälistä alkaen. Kalojen käyttö testieliöinä perustuu usein niiden huomattavaan kalataloudelliseen merkitykseen. Letaalit, jotka ovat yleisesti käytettyjä ja standardisoituja, ovat subletaalitestejä huomattavasti yksinkertaisempia, nopeampia ja halvempia.

4.4.3.2 Standardimenetelmät

4.4.3.2.1 Letaalit

Laajasti hyväksyttyinä akuutin myrkyllisyyden testeinä voidaan pitää seeprakalastandardia, ISO 7346/1/2/3 (1984), joka on parhaillaan uusittavana. Testit eroavat toisistaan testiliuoksen vaihdon perusteella: staattinen, semistaattinen tai läpivirtaussysteemi. Kansallinen standardi, SFS 3035 (1984), määrittää akuutin myrkyllisyyden, 96 h LC50, semistaattisella menetelmällä. Koekalana käytetään seeprakalaa, *Brachydranio rerio*, mutta soveltuvia ovat myös eräät muut trooppiset lajit sekä murto- ja merivedessä elävät lajit. Erilaisia "väljiä" standardeja on useita (ASTM 1981a, APHA 1971 ...), joissa voidaan testiolosuhteet ja kalalaji valita melko vapaasti.

Akuutin myrkyllisyyden määrittämiseen soveltuu myös kansallinen standardi SFS 5073 (1986). Koekalana käytetään kirjolohta, *Oncorhynchus mykiss*, ja testi voidaan tehdä semistaattisesti tai staattisesti makeassa tai murtovedessä. Staattisella menetelmällä määritetään tutkittavan liuoksen 48 h LC50-arvo ja semistaattisella 96 h LC50-arvo.

4.4.3.2 Subletaalitestit

Kalalajin säilyminen luonnossa riippuu poikasten normaalista kehittämisestä. Seeprakalan mädillä ja eri poikasvaiheilla tehty lyhytaikaiset kroonisia myrkyvaikutuksia tutkivat testit ovat osoittautuneet erittäin herkiksi yksilön sietokyvyn ilmentäjiksi.

Kansallisen semistaattisen standardin, SFS 5501 (1991), esikuvana on ruotsalainen standardi kuten myös standardin SFS 3035. Mädin kuolleisuutta sekä poikasten kuoriutumista, kuntoa ja kuolleisuutta seurataan päivittäisten vedenvaihtojen yhteydessä. Testi kestää 12–14 vuorokautta ja testi lopetetaan kun vähintään 90 % mädistä tai poikasista jokaisessa testipitoisuudessa on kuollut. Myrkyvaikutukset arvioidaan suurimman ei näkyviä vaikutuksia antavan ja pienimmän näkyviä vaikutuksia antavan pitoisuuden suhteen verrattuna kontrolliin. Tutkittavat pitoisuudet valitaan akuutin myrkyllisyyden perusteella, joten LC50-arvo on tiedettävä laimennoksia tehtäessä ja tarvittaessa on tehtävä 96 h LC50-testi.

4.4.3.3 Muut testit

Akuuttia toksisuutta voidaan myös arvioida jäännöshappitestillä. Kalat laitetaan hapella kyllästettyihin testiliuoksiin ja astiat suljetaan. Jäännöshappi analysoidaan kalojen kuoltua. Testin antama tulos ei ole yksiselitteinen ja testi soveltuu lähinnä hengitykseen vaikuttavien yhdisteiden tutkimiseen.

Kaloilla subletaaleja myrkyvaikutuksia voidaan tutkia monella eri tavalla. Menetelmät on esitetty pääpiirteissään kohdassa 4.3. krooniset testimenetelmät.

4.4.4 Bakteeritestit

4.4.4.1 Yleistä

Bakteereilla tehty toksisuustestit ovat osoittautuneet halvoiksi, nopeiksi ja käyttökelpoisiksi. Ne ilmentävät myös korkeampiin eliöihin kohdistuvaa myrkyvaikutusta.

4.4.4.2 Valobakteeritesti

Testi perustuu valobakteerin, *Photobacterium phosphoreum*, valontuoton vähenemiseen näkyvällä aallonpituusalueella myrkyllisten aineiden vaikutuksesta. Kyseisen vakavan energia-aineenvaihduntahäiriön perusteella voidaan olettaa valobakteerilla todetusta myrkyvaikutuksesta aiheutuvan vakavaa haittaa myös muiden organismien aineenvaihdunnassa.

Testistä on olemassa jätevesille soveltuva valmis saksalainen standardi DIN 38412 Teil 34 ja ISO-standardi on valmisteilla. Näytteestä tehdään laimennussarjat laimeaan suolaliuokseen ja siirrostetaan valobakteerisuspensiolla. Putket inkuboidaan vakioilämpötilassa ja seurataan luminenssin muuttumista puolen tunnin ajan. Määritetty EC50 -arvo vastaa pitoisuutta, jossa valontuotto on laskennut puoleen verrattuna nollanäytteen.

4.4.4.3 Kasvunestymistesti

Menetelmä perustuu vedessä ja maassa yleisesti esiintyvän bakteerikannan, *Pseudo-monas putida*, solunjakautumisen estymiseen toksisten yhdisteiden takia. Bakteerikantaa kasvatetaan vakio-olosuhteissa useita sukupolvia (16 h) ja kasvunopeuden hidastumista seurataan sameusmittauksella. Saatu EC50 -arvo vastaa pitoisuutta, jossa kasvunopeus on pudonnut puoleen verrattuna nollanäytteeseen.

Testi voidaan tehdä manuaalisesti tai automaattisesti Bioscreen C -laitteella. Menetelmästä on olemassa saksalainen standardi DIN 38412 Teil 8 ja kansainvälinen ISO DIS 10 712, joka valmistunee kesään mennessä.

4.4.4.4 Muut testit

4.4.4.4.1 Hapenkulutuksen estymistestit

Aktiivilietteen mikrobien sopeutumista jäteveten ja sen yhdisteisiin voidaan testata viikon respirometrikokeella. Testi voidaan tehdä suomalaisen standardiehdotuksen VHB 7 mukaan. Hapenkulutuksen lyhytaikaista estymistä eli akuuttista toksisuutta voidaan arvioida standardiehdotuksen ISO DIS 8192 mukaan.

Molempien testien pääperiaatteet ovat samat. Tutkittavasta aineesta tehdään laimennussarja, lisätään helposti hajoavaa ainetta (glukoosi ...) ja siirrostetaan aktiivilietteen bakteereilla. Hapenkulutusta seurataan vakio-olosuhteissa manometrisesti syntyvän hiilidioksidin avulla viikon testissä ja happielektrodilla lyhytaikaisessa testissä.

4.4.4.4.2 Heterotrofisen potentiaalin mittaaminen

Bakteerien heterotrofisen potentiaali voidaan mitata sille hyödyllisen radioaktiivisesti leimatun substraatin sitoutumisaktiivisuutena. Vastaanottavan ympäristön bakteerien sitoutumisaktiivisuudet esim. glukoosiin ilmentävät mikropopulaatioiden elinkykyä ja ympäristön haittavaikutuksia. Menetelmää on kokeiltu Suomessa (Kajaani Oy) ja se on todettu käyttökelpoiseksi.

4.5 Myrkyllisyysarvioinnista

4.5.1 Lyhytaikaiset menetelmät

Yhdisteiden akuuttia myrkyllisyyttä vesieliöille voidaan arvioida LC50/EC50 -arvojen avulla. Testit suositellaan tehtäväksi vesieliöiden herkkyyssvaihtelujen vuoksi useammalla trofiatason lajilla ja tuloksista valitaan päästörajoitusten kannalta alhaisin arvo.

Karkeasti voidaan akuuttitoksisuus luokitella vesieliöille:

LC50/EC50 (mg/l)	Luokka
<1	hyvin myrkyllistä
1 – 10	kohtalaisen myrkyllistä
10 – 100	lievästi myrkyllistä

Testien perusteella voidaan myrkyllisyys suhteuttaa jätevesivirtaamiin ja tuotannon määrään seuraavasti:

$$\begin{aligned} \text{TU (toksisuusyksikkö)} &= 100 \times 1/\text{LC50} \\ \text{TER (toksisuuskuorma)} &= \text{TU} \times Q \text{ (1000 m}^3\text{/d), missä} \\ &\quad Q \text{ (m}^3\text{/aika) on jäteveden virtaama} \\ \text{TEF (toksisuuskerroin)} &= \text{TU} \times Q/P \text{ (m}^3\text{/d), missä} \\ &\quad P \text{ (tn/aika) on tehtaan tuotanto} \end{aligned}$$

Monissa eri julkaisuissa on esitetty erilaisia turvakertoimia, jotka vaihtelevat ainakin välillä 0,001 – 0,1. Esimerkiksi Euroopan sisävesikalastuskomissio (EIFAC) ja kemi-kaalien ympäristövaarallisuusprojektin loppuraportti (ESTHER) suosittavat käytettäväksi kerrointa 0,001 ja esittävät pitoisuutta $0,001 \times \text{LC50}$ vesieliöstölle haitattomana. EEC:n teknillisessä raportissa 13 (1984) oletetaan kroonisten tulosten puuttuessa, että kroonisia ja subletaaleja vaikutuksia ei todennäköisesti esiinny alle 1 % LC50-pitoisuuksissa.

Akuuteilla testeillä saadaan ainoastaan alustavaa ja suhteellista myrkyllisyystietoutta, jota voidaan käyttää yhdisteiden, jätevesien ja niiden fraktioiden toksisuusarviointeihin sekä toksisuuskuormituksen arviointiin.

4.5.2 Pitkäaikaiset menetelmät

Kroonisissa ja subletaalitesteissä etsitään myrkyvaikutuksen kohde ja pitoisuus, jossa myrkyvaikutusta ei ole enää havaittavissa (NOEC-arvo). Pitkäaikaiset testit ovat huomattavasti luotettavampia laboratoriossa tehtynäkin kuin akuutit testit. Esimerkiksi kalatesteillä voidaan selvittää:

- ovatko ne myrkyvaikutuksen alaisia
- haitallisten aineiden vaikutus niiden elintoimintoihin
- niiden haitallisten yhdisteiden muokkaus- ja poistokykyä

Myrkyllisyyttä voidaan arvioida seuraavasti:

NOEC (mg/l)	Luokka
<0,01	hyvin myrkyllistä
0,01 – 0,1	myrkyllistä
0,1 – 1,0	lievästi myrkyllistä

4.6 Hajoavuus

4.6.1 Yleistä

Vesistöissä kemikaalien ja jätevesien rakenne muuttuu biologisissa, kemiallisissa tai fotokemiallisissa reaktioissa. Hyvin nopeasti hajoavat aineet eivät ehdi vaikuttaa laajoilla alueilla, mutta vaikeasti hajoavat aineet voivat levitä laajoille alueille, kertyä helposti ympäristöön ja aiheuttaa haittoja pieninäkin pitoisuuksina.

Yhdisteiden biohajoavuuteen vaikuttavat kemikaalien ominaisuudet (poolisuus, hydrofobisuus ...), hajottava mikropopulaatio, fysikaaliskemialliset olosuhteet ja näiden kaikkien vuorovaikutukset. Erityisesti omat pohjoiset erityisolosuhteemme, alhainen pH ja lämpötila, vesien ja maiden niukka ravinnesisältö ja näihin oligotrofisiin olosuhteisiin mukautunut mikrobisto, vaikuttavat kemikaalien hajoavuuteen hidastavasti. Biohajoavuustestien tuloksia on olosuhteissamme arvioitava erityisen huolellisesti.

4.6.2 Testien periaatteet

Testit pyrkivät jäljittelemään spesifioitua ympäristöä, mutta testien olosuhteet ovat yleensä kompromisseja ihannetilan, taloudellisuuden ja käytännön välillä. Testit voidaan jakaa kolmeen ryhmään: välittömän (ready) ja luontaisen (inherent) hajoavuuden testeihin sekä simulointitesteihin. Välitön hajoaminen merkitsee nopeaa hajoamista ankarissa testiolosuhteissa ilman sopeutumisaikaa, jonka taas luontaisesti hajottava mikrobipopulaatio tarvitsee hajotusmetabolian aktivoimiseksi. Simulointitesteissä jäljitetään jätevedenpuhdistamon toimintaa.

Testiin vaikuttavat erityisesti siirroksen lähde, suuruus ja sopeuttaminen yhdisteeseen. Siirroksessa tulee olla edustava ja elinkelpoinen mikrobipopulaatio ja yleisimmissä testeissä käytetään kunnallisen jätevedenpuhdistamon aktiivilietettä.

Testeissä mitataan liuenneen orgaanisen hiilen poistumaa (DOC), hiilidioksidin tuottoa tai hapen kulutusta, joita verrataan teoreettiseen arvoon. Yhdisteiden hajoamistuotteita ja -reittejä voidaan määrittää esim. HPLC- tai leimaustekniikalla.

Testausaika on tavallisesti 28 vuorokautta. Välittömästi hajoavan aineen tulee hajota 70 %:sti 10 päivässä hajoamisen alkuhetkestä ja hitaasti hajoavan aineen 70 %:sti testausaikana.

4.6.3 Menetelmät

Käytössä olevia menetelmiä on useita (OECD, ISO ja EC), joista on koottu lista liitteeseen yksi. Testiliuokset ovat suurinpiirtein samoja ja siirros otetaan Miti-testiä luukuunottamatta aktiivilietteestä, poistuvasta jätevedestä, pintavedestä tai maauutteesta. Vertailukemikaalien (aniliini, asetaatti, bentsoaatti ...) tulee hajota vähintään 70 %:sti ja rinnakkaistestien hajonta saa olla enintään 20 %.

Biologisen hajoavuuden karkea arviointi voidaan tehdä biologisen ja kemiallisen hapenkulutuksen suhteesta. Mikäli suhde BOD_5/COD on pienempi kuin 0,5, ei ainetta pidetä biologisesti helposti hajoavana.

4.6.4 Soveltuvuus

Hajoavuutta voidaan arvioida noudattamalla esimerkiksi OECD:n hajoavuustestauksen reittikaaviota, joka on esitetty liitteessä kaksi.

VYL:n mikrobiologian laboratoriossa on tutkittu mm. testejä ISO 9888, ISO 7827, OECD 301F ja headspace (Struijs ja Stoltenkamp) liman- ja homeentorjunta-aineilla sekä herbisideillä. Selkeimmät ja toistettavimmat tulokset on saatu Zahn-Wellens -testillä, jossa tutkittavaa näytettä inkuboidaan kuukausi ilmastetussa liuoksessa aktiivilietteen kanssa. DOC:n muuttumista seurataan ajan funktiona ja kontrolleina käytetään tapettua liuosta, ilman tutkittavaa yhdistettä olevaa aktiivilietettä ja vähintään 70 % hajoavaa etyleeniglykoliliuosta.

4.7 Kertyvyys

4.7.1 Yleistä

Kertyvyys elollisiin organismeihin ympäristöä suurempina pitoisuuksina kuuluu ympäristömyrkyt perusominaisuuksiin. Kertyvyyttä ja siten mahdollista rikastuvuutta ravintoketjussa voidaan suoraan mitata biokonsentraatiokertoimen (BCF) tai arvioida jakaantumiskertoimen (K_{ow} =n-oktanolivesi) avulla. OECD:n menetelmäsuosituksissa 305A – 305E on käytetty testieliönä kalaa ja esitetty erilaisia koejärjestelyitä (staattinen, semistaattinen, läpivirtaus) haitallisten aineiden kertyvyyden määrittämiseksi.

4.7.2 Biokonsentraatiokerroin

BCF kuvaa aineen biologista kertyvyyttä määrittämällä aineen pitoisuuden suhteen testieliimessä ja ympäristössä. Bioakkumuloitumiskokeissa käytetään tavallisesti kaloja ja simpukoita. Eläinplanktonin käyttö kenttäolosuhteissa on myös suositeltavaa suuren pinta-ala/tilavuus -suhteen sekä hydrofobisten kalvojen takia, jotka mahdollistavat nopean akkumuloitumisen.

Yleisesti voidaan sanoa, jos

BCF = 10 000, niin aine on merkittävästi kerääntynyt eliöön

BCF = 1, niin aineen pitoisuus eliössä on sama kuin ympäristössä

BCF = 0,01, niin aineen pitoisuus eliössä on alhaisempi kuin ympäristössä

Ainetta ei kuitenkaan pidetä kertyvänä, jos kalatestissä saatu kertyvyystekijä on pienempi kuin sata. Aine on kertyvä, jos BCF-arvo on koko kalalle yli 100 ja voimakkaasti kertyvä, jos arvo on yli 1000.

4.7.3 Oktanoli/vesi –jakaantumiskerroin

Kertyvyystaipumusta voidaan arvioida jakaantumiskertoimen K_{ow} avulla, joka kuvaa aineen rasvaliukoisuutta, koska oktanolin ja eläinrasvojen poolisuus on sama. Mitä suurempi jakaantumiskertoimen arvo on eli mitä rasvahakuisempi aine on, sitä todennäköisempää on sen kertyminen. Eräiden aineiden (Hg ...) kertymistaipumus ei riipu niiden rasvaliukoisuudesta.

Ainetta voidaan pitää mahdollisesti kertyvänä, jos jakaantumiskerroin on yli 1000 ja mahdollisesti erittäin kertyvänä, jos kerroin on yli 100 000.

4.8 Mutageenisuus

Jätevedet ja kemikaalit voivat vaurioittaa organismien perintötekijöitä aiheuttaen eliölle periytyvän sukupolvesta toiseen siirtyvän vaurion. Testieliöinä voidaan käyttää bakteereja, hiivoja tai nisäkässoluja. Tunnetuin 1970-luvun alussa kehitetty mutageenisuustesti on Amesin testi ja uutena lupaavana tulokkaana on Mutatox-testi.

4.8.1 AMES-testi

Amesilta löytyy noin 60 bakteerikantaa, joista yleisesti käytettyjä *Salmonella* -kantoja on 20 (*Salmonella typhimurium*). Testiä on paljon tutkittu ja se on luotettava, mutta sen käyttöä rajoittaa testin vaativuus. Suomessa testejä tehdään ainoastaan VTT:llä ja Kuopion kansanterveyslaitoksessa testien vaatiman GLP-laatutason vuoksi.

Bakteerikannat ovat histidiinimutantteja ja mutaation seurauksena revertoitunut bakteeri pystyy syntetisoimaan itse tarvitsemansa histidiinin. Näytteitä inkuboidaan 48 tuntia, liuottimena käytetään DMSO:ta ja mutageenisuutta arvioidaan pesäkelaskurilla vertaamalla histidiinirevertanttien pesäkelukumäärää spontaanilukumäärään. Korkeimpien eliöiden metabolia otetaan huomioon lisäämällä esim. rotan maksasta eristetty mikrosomifraktio (*metabolinen aktivaatio*).

4.8.2 MUTATOX-testi

Testi perustuu aikaisemmin mainitun valobakteerin (4.4.4.1.), *Photobacterium phosphoreum*, pimeään mutantiin (M169). Testistä on pyritty tekemään mahdollisimman yksinkertainen, herkkä ja halpa. Näytteen toksisuus ja genotoksisuus voidaan määrittää samanaikaisesti. Näytteitä inkuboidaan 18 tuntia, liuottimena käytetään esim. DMSO:ta ja luminisenssi mitataan fotometrillä. Mutatox-testi on osoittautunut monissa tapauksissa herkemäksi kuin Ames-testi (Kwan ja Dutka). Testillä on saatu hyviä tuloksia käyttämällä liuottimena pelkkää vettä (Milli-Q) ja käyttämättä maksahomogenaattia.

5 YMPÄRISTÖVAARALLISUUDEN ARVIOINTI

5.1 Yleistä

Yhdisteiden ympäristövaarallisuutta kuvaavat tekijät ovat:

- 1 pysyvyys (hajoavuus)
- 2 biologinen kertyvyys
- 3 toksisuus (myös genotoksisuus)

Ekotoksikologisesti hajoavuudella on suurin merkitys, koska vaikeasti hajoavat yhdisteet voivat levitä laajoille alueille ja säilyä ympäristössä pitkään. Pohjoismaisen ministeri-neuvoston asettaman työryhmän ympäristöraportissa (1990) kemikaali luokitellaan ympäristölle vaaralliseksi, jos se on

- 1 hyvin myrkyllinen
- 2 myrkyllinen ja biokertyvä tai heikosti biohajoava
- 3 biokertyvä ja heikosti biohajoava

Raportissa aine on akuutisti hyvin myrkyllistä, jos suhde $LC_{50}/EC_{50} \leq 1$ mg/l (levä, kala ja vesikirppu) ja myrkyllistä, jos suhde ≤ 100 mg/l. Aine on biokertyvää tai potentiaalisesti biokertyvää, jos sen BCF kalalle ≥ 100 tai $\log K_{ow} \geq 3$. Yhdiste määritetään huonosti biohajoavaksi, jos se ei hajoa OECD:n 28 päivän biohajoavuustestissä tai sen $BOD_5/COD \leq 0,5$.

Testit tulisi valita jätevesien ja vesistön kriittisten ominaisuuksien perusteella. Esimerkiksi päästöistä avoimille ja siten hyvän vedenvaihtuvuuden alueille tulee painotuksen olla yhdisteiden hajoavuudessa ja kertyvydessä, sillä aineiden rikastuminen saattaa merkitä suurta ekologista riskiä tulevaisuudessa, vaikka akuutteja toksisia vaikutuksia ei havaittaisi. Toisaalta pienimmissä vesistöissä yhdisteiden toksisuus voi olla korkea ja aiheuttaa jopa eliöyhteisöjen häviämisen.

Kirjallisuudesta löytyy huomattava määrä vakiomenetelmillä eri yhdisteillä laboratoriossa tehtyjä myrkyllisyystestejä. Testit soveltuvat yhdisteiden keskinäiseen vertailuun, sillä vesistövaikutuksia arvioitaessa on myös huomioitava tarkasteltavan vesistöalueen luonne ja ominaispiirteet. Vesistöjemme erityispiirteitä ovat laimentumista ehkäisevä reittimäisyys ja kerrostuneisuus, yhdisteiden fysikaalista, kemiallista ja biologista hajoamista haittaava alhainen lämpötila ja jääpeite sekä usein myrkyvaikutusta lisäävä vedenlaatu (pH, kovuus, puskurikapasiteetti, humus ...).

Vesistön käyttötarkoitus on myös huomioitava yhdisteiden ympäristövaarallisuutta arvioitaessa. Jos vesistö on kalataloudellisesti tärkeä, on kiinnitettävä erityistä huomiota kertyviin ja mutageenisiin yhdisteisiin.

5.2 Testiohjelmat

5.2.1 Perustiedot

Aluksi tulee arvioida käytössä olevat tiedot ja selvittää päästöistä tunnettujen aineiden kirjallisuustiedot sekä aloittaa alustavat tutkimukset (analyysit). Selvitykset koskevat raaka-aineita, prosesseja, puhdistustoimenpiteitä, päästöjen määrää ja paikkaa sekä vesistötietoja ja mahdollisia velvoitetarkkailuja.

5.2.2 Testaussuosituksia

Koe-eliöinä suositellaan käytettäväksi tutkittavan vesityypin lajeja. Standardi- ja yleisluontoiset menetelmät tulee valita vähintään siten, että ne soveltuvat tutkittavalle vesityypille (suolainen/makea).

Perustutkimukset on tehtävä testieliöiden herkkyysvaihteluiden vuoksi useammalla ravintoketjun trofiatasolla. Testien täytyy edustaa ja mitata tärkeimpiä biologisia perusasioita (elossapysyminen, lisääntyminen ...).

Varsin hyvänä peruspakettina menetelmien alustavaan seulontaan voidaan pitää:

- 1 bakteeritesti; valobakteeri ja kasvunestymistesti
- 2 levättesti; EC50 72 h
- 3 vesikirpputesti; EC50 24 h ja 21 vrk (elämänkiertotesti)
- 4 kalatesti; seeprakala LC50 96 h ja 12–14 vrk (elämänkiertotesti)
- 5 biologinen hajoavuus (jos ei ole tiedossa)
- 6 biologinen kertyvyys (jos ei ole tiedossa)
- 7 mutageenisuus (jos ei ole tiedossa)

Testiohjelma on hyvä aloittaa akuuteilla testeillä sekä lyhytaikaisilla kroonisilla testeillä ja vasta tämän jälkeen siirtyä monimutkaisempiin kroonisiin testeihin. Laboratoriotuloksia tulee täydentää kenttäkokeilla ja tutkia molempien keskinäistä korrelaatiota. Bakteereilla tehty akutit ja pitkäaikaiset myrkkytetit ovat usein korreloineet kaloilla ja vesikirpuilla saatuihin tuloksiin, joten ne kannattaa muidenkin aikaisemmin lueteltujen ominaisuuksiensa takia sisällyttää aina testiohjelmaan.

Yhdisteiden myrkkyyvaikutusta on selvitetty myös ekologisten mallien avulla. Mallekosysteemikokeet ovat laajoja sekä pitkäaikaisia ja niitä ei voida toistaiseksi pitää rutiinimenetelminä.

5.3 Kemiallinen vaikutusten arviointi

Analyysimenetelmät tulee valita toksisuutta aiheuttavien aineiden perusteella. Jos prosessi tunnetaan hyvin eli tiedetään raaka-aineet, tuotteet ja sivutuotteet, on analyysiohjelman laatiminen suhteellisen helppoa. Kemiallinen arviointi voidaan tehdä useassa vaiheessa. Aluksi voidaan määrittää orgaanisen aineen kokonaismäärä TOC- ja COD-analyysillä kahdesta fraktiosta, joissa yhdisteet on jaettu moolimassan perusteella

(rajana $M = 1000$). Mikäli aineet tunnetaan, voidaan tehdä aineryhmäkohtainen analyysi ja yksittäisistä aineista tarkemmat analyysit. Lopulta voidaan selvittää biologisen vaikutuksen yhteyttä fraktioihin ja keskittää kemiallinen arviointi toksisiin fraktioihin.

6 TOKSISUUSTESTIEN STANDARDISOINNISTA

Toksisuustestit voidaan jakaa kahteen päätyyppiin:

- 1 yleisluonteiset suositukset
 - testit pääperiaatteeltaan selostettuja
 - testaajalla valinnanvapautta
- 2 standardit ja standardiehdotukset
 - täsmällisiä
 - yksityiskohtaisia
 - vertailukelpoisia

Suomessa toksisuustestityöryhmä on valmistellut mm. kotimaiset standardit: SFS 3035, SFS 5062, SFS 5072, SFS 5073 ja SFS 5501. Ryhmä on pyrkinyt kannanotoillaan edistämään ekotoksikologisten menetelmien käyttöönottoa Suomessa. INSTA:n lopettaminen vuonna 1992 haittaa pohjoismaista yhteistyötä. Ryhmällä ei ole ollut varojen puutteen vuoksi mahdollisuutta osallistua kansainvälisiin ISO-standardisointikokouksiin. Standardiehdotukset ovat ainoastaan kiertäneet lausuntokierroksella. Ryhmä on osallistunut ISO-standardeihin paljolti pohjautuvien CEN-standardien valmistelutyöhön. EY-direktiivit ja Suomen EFTA-jäsenyys lisäävät CEN-standardien merkitystä ja velvoitetta maattamme kohtaan. Suomen erityisolosuhteiden ottaminen huomioon lienee kuitenkin vaikeaa, joten omat kansalliset standardimme, modifioidut CEN- ja ISO-standardit, antanevat luotettavimmat testitulokset. Tämä johtaa kuitenkin ristiriitaisuuksiin, kun verrataan eri maiden tuloksia keskenään.

7 TOKSISUUSTESTIEN TUTKIMUS- JA KÄYTTÖÖNOTTOMAHDOLLISUUDET

7.1 Vesi- ja ympäristöviranomaiset

Vesien ja ympäristöntutkimuslaitoksen biologisessa ja mikrobiologisessa laboratoriossa on valmiudet monipuolisiin ekotoksikologisiin tutkimuksiin. Lisäksi vesi- ja ympäristöhallituksen "näytepankkiin" on kerätty runsaasti vesi- ja kalanäytteitä 1970-luvun alusta lähtien. Yksi kolmesta valtakunnallisesta aluelaboratoriosta, Helsingin vesi- ja ympäristöpiiriin laboratorio, sijaitsee samassa rakennuksessa vesi- ja ympäristöhallituksen laboratorion kanssa. Koska piirillä on sijaintinsa vuoksi varsin suuri tarve haitallisten aineiden ympäristövaikutusten arvioimiseen, tulisi testien soveltaminen ja käyttö aloittaa

laajamittaisesti juuri täällä. Muilla piireillä on perusvalmiudet tehdä yksinkertaisia levä- ja vesikirpputestejä, joita on tehty yksittäistapauksissa. Keski-Suomen vesi- ja ympäristöpiirissä on käytetty simpukkamenetelmää yhdisteiden bioakkumuloitumisen arvioimisessa.

7.2 Yliopistot

7.2.1 Helsingin yliopisto

Helsingin yliopiston eläintieteen laitoksen fysiologian osastolla tutkitaan ympäristön vaikutusta makean veden eliöihin; kalojen punasolujen ja kidusten toiminnan tutkimus sekä simpukkatutkimukset.

Limnologian laitoksella voidaan tehdä vesikirppu-, levä- ja kalatestejä.

7.2.2 Joensuun yliopisto

Joensuun biologian laitoksella on meneillään monta vesistöjen toksikologista projektia. Yliopistossa tehdään myös ekotoksikologisia palvelututkimuksia ja se kehittyyne Joensuun Tiedepuiston myötä.

7.2.3 Jyväskylän yliopisto

Biologian laitoksen ekologian osasto on keskittynyt lähinnä maaperävaikutusten tutkimiseen (lierot). Kemian laitoksen orgaanisella osastolla on meneillään laaja ohjelma: orgaanisten yhdisteiden rakennetutkimuksen soveltaminen kemiallisessa ekotoksikologiasa. Ohjelman yhtenä osana on ympäristöriskin arviointi, jossa Keski-Suomen vesi- ja ympäristöpiiri on ollut mukana kehittämässä laboratoriomikrokosmosta. Ympäristöntutkimuskeskus tutkii ja myy palveluksiaan. Ympäristökemian laboratoriossa on mahdollisuus vesikirpputesteihin ja tulevaisuuden suunnitelmiin kuuluu ekotoksikologisten vaikutusanalyysien kehittäminen (*simuloidut ekosysteemit...*). Laboratoriossa on meneillään tutkimus haitallisten aineiden kulkeutumisesta ja kertymisestä ympäristössä.

7.2.4 Kuopion yliopisto

Kuopiossa ympäristötieteiden laitokset ovat yhteistyössä keskenään. Fysiologian laitoksella tutkitaan mm. jätevesien vaikutusta kalojen ja niiden viljeltyjen maksasolujen elinkykyisyyteen ja vierasaineaineenvaihduntaan. Teknisen ympäristöhygienian laitoksessa tutkitaan jätteitä ja jätevesiä sekä maaperän mikrobiologiaa. Maamikrobien hajotuskykyä voidaan tutkia in vitro-kokeina.

7.2.5 Turun yliopisto

Biologisen laitoksen eläinekologian osastolla selvitetään mm. yhdisteiden eliöille aiheuttamien subletaalien vaikutusten ja luontaisten puolustusreaktiomuutosten vaikutuksia eliöiden keskinäisiin vuorovaikutussuhteisiin. Ekologian ja eläinsystematiikan laboratoriossa on meneillään tutkimukset syanobakteerien (sinilevät) akuuteista ja suble-taaleista myrkyvaikutuksista vesikirppukokeilla.

Satakunnan ympäristötutkimuskeskuksessa on mahdollista tehdä vesikirpuilla akuutti- ja elämänsykli-testejä. Ekotoksikologinen yksikkö tulee lisäämään testivalikoimaansa sekä osallistumaan testimenetelmien kehittämiseen ja vertailuun. Laitoksella on meneil-lään mm. jokiin soveltuvien biotestien tutkimus.

7.2.6 Åbo Akademi

Orgaanisen kemian laitoksella tutkitaan juomaveden mutageenisuutta. Puukemian laitoksen tutkimukset liittyvät metsäteollisuuden prosessi- ja jätevesiselvityksiin.

7.3 Oy keskuslaboratorio

Keskuslaboratoriossa on tehty haitallisten aineiden tutkimusta 1960-luvulta lähtien. Laitoksella on valmiudet akuutteihin testeihin (levä, vesikirppu ja kala) sekä pitkäai-kaistesteihin. Valobakteeritesti on kehitteillä. Laitoksella on pyrkimyksenä käyttää toksisuustestejä apuna "puhtaampien" prosessien kehittämiseen, joissa pyritään vähentä-mään haitallisten aineiden muodostumista.

7.4 Suomen Ympäristötutkijaryhmä Oy

Tutkijaryhmä on riippumaton yksityinen yritys, jolla on yhteistyötä vastaavan ruotsalai-sen ryhmän kanssa. Ryhmä käyttää eri tutkimuslaitosten ja yliopistojen analyysipalvelu-ja. Ryhmä on tehnyt mm. kemikaalien ja jätevesien malliekosysteemitutkimuksia ja sillä on esim. Nauvossa mahdollisuus suorittaa murtoveden malliekosysteemitutkimuksia.

7.5 Vaasan kaupungin maanviljelys- ja kauppakemiallinen laboratorio

Laboratoriossa on muutamia vuosia sitten tehty teollisuuden jätevesien myrkyllisyysar-viointia jäteveden puhdistamon aktiivilietteen mikrobeilla.

7.6 Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus

VTT:n elintarvikelaboratoriossa on mahdollista tehdä Amesin testi ja valobakteeritesti.

8 YHTEENVETO

Vesistöihin kohdistuva toksisten vaikutusten vähentäminen on tärkeä vesiensuojelun tavoite. Suomessa myrkyllisyystestaus on satunnaista, vaikka sille olisi selvät lainsäädännölliset ja hallinnolliset mahdollisuudet. Monissa maissa biotestejä käytetään rutiininomaisesti täydentämään fysikaalis-kemiallista analytiikkaa, joka ei yksistään kykene selvittämään yhdisteiden vaikutuksia elolliseen luontoon.

Pitoisuuksien ja vaikutusten välinen riippuvuus saadaan määritetyksi biotesteillä. Niillä voidaan tutkia yhdisteiden yhteisvaikutusta ja toisaalta yksittäisen tekijän vaikutusta pitämällä olosuhteet vakioina muilta osin. Toksisuustestin valinta täytyy tehdä tapauskohtaisesti. Tutkimukset voidaan aloittaa letaalitesteillä, mutta pyrkimyksenä tulee olla kroonisten myrkyvaikutusten selvittäminen.

Haitallisten aineiden ympäristövaarallisuutta arvioitaessa yhdisteiden toksisuuden lisäksi tulee arvioida niiden pysyvyys ja kertyvyys. Jätevesien ja vesistön ominaisuudet sekä vesistön käyttötarkoitus vaikuttavat toksisuuden, pysyvyyden ja kertyvyyden keskinäiseen painotukseen.

Suomen tulee osallistua aktiivisesti ekotoksikologisten menetelmien standardisointiin ja menetelmäkehittelyyn. Jatkossa tulee aloittaa laboratorioiden välinen laadunvalvonta (*interkalibrointi*). Tällöin voitaisiin vertailututkimuksilla helposti selvittää eri menetelmien soveltuvuutta erilaisiin myrkyllisyysarviointeihin. Laboratoriossa tehtyjen kokeiden ja kenttäkokeiden välistä riippuvuutta tulee selvittää vertaamalla eliöillä laboratoriossa tehtyjen pitkäaikaiskokeiden tuloksia luonnonvesissä sumputettujen tai pyydystettyjen testituloksiin.

Vesi- ja ympäristöhallituksen näytepankin hyväksikäyttöä tulee tehostaa. Haitallisten aineiden kaikki tutkimus-, seuranta- ja tarkkailutulokset tulisi keskittää avoimeen tietorekisteriin. Tämä vaatii sekä resursseja että laajaa yhteistyötä viranomaisten ja tutkijoiden kesken.

KIRJALLISUUS

- Ahtiainen, J. Haitallisten aineiden ja veden mikrobien väliset vuorovaikutukset. Välikirje 1992. 13 s.
- Ames ym. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome test. *Mutat. Res.*, vol. 31, s. 347–364.
- Brouwer, H. 1990. A sediment-contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, s. 1353–1358.
- DIN 38 412 Teil 8. 1991. Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Bakterien *Pseudomonas*-Zellvermehrungs-Hemmtest.
- DIN 38 412 Teil 34. 1991. Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*.
- ISO 6341. 1989. Water quality. Determination of inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).
- ISO 7346/1/2/3. 1984. Water quality. Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish. Static/Semistatic/Flow-through method.
- ISO 7827. 1991. Water quality. Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium. Method by analysis of dissolved organic carbon.
- ISO 8692. 1989. Water quality. Algal growth inhibition test.
- ISO 9888. 1991. Water quality. Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium. Static test. Zahn-Wellens method.
- ISO/DIS 8192. Water quality. Test for inhibition of oxygen consumption of activated sludge.
- ISO/N28. 1987. Prolonged toxicity study with *Daphnia magna*: effects on reproduction.
- ISO/TC 147/SC 5/WG 1. 1991. Testing of water. Determination of the inhibition of the light emission of *Photobacterium phosphoreum*.
- ISO/TC 147/SC 5/WG 1 N133. Determination of the inhibitory effect of water constituents on bacteria (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test).
- Kuparinen, J. & Niemi, M. 1984. The effect of effluents from a sulphite cellulose factory on microbial heterotrophic activity in fresh water. *Ecological Bulletins*, vol. 36, s. 143–149.
- Kemikaalitutkimuksen kehittämistyöryhmä. 1988. Kemikaalitutkimuksen kehittämisohjelma ympäristöministeriön toimialalla 1991–95. Työryhmän mietintö. Ympäristöministeriö. 45 s.
- Kemikaaliasetus. 1990. N:o 620, s. 1174–1188.

- Kemikaalilaki. 1989. Suomen säädöskokoelma, N:o 744, s. 1325–1337.
- Kwan, K. & Dutka, B. 1990. Simple two-step extraction procedure for use in genotoxicity and toxicity bioassays. *Toxicity Assessment*, vol. 5, s. 395–404.
- Kylä-Harakka-Ruonala, T. 1989. Chemicals risk modelling: Toxic effect risks imposed on aquatic organisms by industrial activity. Helsinki, National Board of Waters and the Environment, Finland, 56 s.
- Luotola, M. & Verta, M. 1992. Haitallisten aineiden tutkimuksen kehittäminen vesi- ja ympäristöhallinnossa 1992–1995. Kehittämisohjelma. Ympäristöministeriö. 104 s.
- Naturvårdsverket. 1981. Karakterisering av industriella avloppsvatten. Lägesrapport från ett projektområde. Statens naturvårdsverk PM 1450, 63 s.
- Nikunen, E. ym. 1986. Kemikaalien myrkyllisyys vesieliöille. Ympäristöministeriö. 348 s. Ympäristön ja luonnonsuojeluosaston julkaisu D:15.
- Nordforsk. 1982. Ekotoksikologiset menetelmät vesitutkimuksissa. Osa 1: Hallinnollinen arviointi. Pohjoismaisen projektin raportti. Miljövårdsserien, 1982:1 A, 23 s.
- Nordic Council of Ministers. 1990. Substances and preparations dangerous for the environment. A system for classification, labelling and safety data sheets. Final Report from a Nordic Working Group. Miljørapport 1990:10E, NORD 1990:87E, 65 s.
- OECD. 1981. Guidelines for testing of chemicals
- | | |
|------|--|
| 201 | Alga, growth inhibition test |
| 202 | Daphnia sp., 14-day reproduction test. |
| 203 | Fish, acute toxicity test. |
| 305A | Sequential static fish test |
| 305B | Semi-static fish test |
| 305C | Degree of bioconcentration in fish |
| 305D | Static fish test |
| 305E | Flow-through fish test |
- OECD. 1986. Proceedings of the international seminar on the use of biological tests for water pollution assessment and control. Italy, ISPRA Research Centre, 101 s.
- OECD. 1987. The use of biological tests for water pollution assessment and control. Environment Monographs, no. 11, 70 s.
- SFS 3035:Sv. 1984. Vesitutkimukset. Kemiallisten aineiden akuutin myrkyllisyyden määrittäminen makean veden kalalla. Semistaattinen menetelmä.
- SFS 5062. 1984. Vesitutkimukset. Akuutin myrkyllisyyden määrittäminen Daphnia magna Straus vesikirpulla.
- SFS 5072. 1986. Vesitutkimukset. Myrkyllisyystesti leväpuhdasviljelmällä.

- SFS 5073. 1986. Vesitutkimukset. Akuutin myrkyllisyyden määrittäminen kirjolohella, *Salmo gairdneri* Richardson, Teleostei, Salmonidae. Staattinen ja semistaattinen menetelmä.
- SFS 5501. 1991. Vesitutkimukset. Myrkyllisyyden määrittäminen seeprakalan mädin ja kuoriutuneiden poikasten avulla. Semistaattinen menetelmä.
- Struijs, J. & Stoltenkamp, J. 1990. Headspace determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 19, s. 204–211.
- Vesihallitus. 1980. Toksisuuden ennustamisesta matemaattisen mallin avulla. Keski-Suomen vesipiirin vesitoimisto. 29 s. Vesihallituksen monistesarja 37.
- Vesihallitus. 1982. Vesihallinnossa käytettävät kalojen kliinis-kemialliset ja histologiset määrittämenetelmät. 40 s. Vesihallituksen monistesarja 98.
- Vesihallitus. 1984. Kajaani Oy:n paperitehtaan jätevesien vaikutukset vastaanottavan vesistön bakteeritoimintaan. Kainuun vesipiirin vesitoimisto. 18 s. Vesihallituksen monistesarja 269.
- Vesi- ja ympäristöhallitus. 1989. Ekotoksikologisten testimenetelmien käyttö vesitutkimuksissa. Projektin loppuraportti. 53 s. Vesi- ja ympäristöhallituksen monistesarja 189.
- Vesi- ja ympäristöhallitus. 1992. Kemikaalien ympäristövaikutusten arvioiminen. Kurssiaineisto.
- Vesi- ja ympäristöhallitus. 1992. Tietolähteitä kemikaalien ympäristövaikutuksista. 55 s. Vesi- ja ympäristöhallituksen monistesarja 356.
- Vesi- ja ympäristöhallitus, Ympäristötietokeskus. 1992. Kemikaalit ja kertymät. Ympäristökatsaus no. 7, s. 3–4.
- Vesilaki. 1991. Helsinki, Valtion painatuskeskus. 163 s.
- VHB-7. Vesitutkimukset. Myrkyllisyys- ja sopeutumistesti heterotrofisilla mikro-organismeilla – orgaanisen aineen aerobinen hajotus vedessä.
- YVA '92-työryhmä. 1992. Ympäristövaikutuksen arviointi. Työryhmämietintö 65. Ympäristöministeriö, ympäristönsuojeluosasto. 76 s.

LIITE 1. LISTAMENETELMÄT

Seuraavassa lista menetelmistä:

OECD:n menetelmät

välitön hajoaminen:

- 301A DOC Die Away
- 301B CO₂ Evolution (Mod. Sturm test)
- 301C MITI (I) Test (Japan)
- 301D Closed Bottle
- 301E Mod. OECD Screening
- 301F Manometric Respirometry

hidas hajoaminen:

- 302A Mod. Semi-Continuous-Activated-Sludge (SCAS)
- 302B Mod. Zahn-Wellens

simulaatio:

- 303A Aerobic Sewage Treatment: Coupled Units Test

EC:n menetelmät

välitön hajoaminen:

- C.3. Modified OECD Screening
- C.4. Mod. AFNOR (NF T90/302)
- C.5. Mod. Sturm Test
- C.6. Closed Bottle
- C.7. Mod. MITI (I)
- C.8. BOD Test

hidas hajoaminen:

- Mod. SCAS
- Mod. Zahn-Wellens

simulaatio:

- Activated Sludge Simulation Test

ISO:n menetelmät

HUOM! Ei jakoa välittömän ja hitaamman hajoamisen välillä.

- ISO 7827 Method by analysis of dissolved organic carbon (1985), 1991
- ISO 9408 Method by determining the oxygen demand in a closed respirometer (1991)
- ISO 9439 Method by analysis of released carbon dioxide (1991)
- ISO 9887 SCAS test
- ISO 9888 Zahn-Wellens test

simulaatio:

- ISO/TC147/SC5/WG4 N140 Activated Sludge Simulation Test (1991)

LIITE 2. OECD:N HAJOAVUUSTESTAUKSEN PERIAATE

OECD:N HAJOAVUUSTESTAUKSEN PERIAATE

(flow scheme of biodegradation)



